

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 24520091153006

UDC\_\_\_\_\_

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

TNFAIP8 在腫瘤發生發展中的機制研究

The Mechanism study of TNFAIP8 in Tumorigenesis

倪 曉 妍

指 導 教 師 : 高 豐 光 教 授

專 業 名 稱 : 微 生 物 學

論文提交日期 : 2012 年 5 月

論文答辯時間 : 2012 年 月

學位授予日期 : 2012 年 月

答辯委員會主席: \_\_\_\_\_

評 閱 人: \_\_\_\_\_

2011 年 5 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名): 倪晓妍

2012 年 5 月 20 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（    ☒    ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：倪晓妍

2012 年    5 月 20 日

## 缩略语索引

缩略语	英文全名	中文全名
TNFAIP8	Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced protein 8	肿瘤坏死因子诱导蛋白 8
FBS	fetal bovine serum	胎牛血清
FCM	flow cytometry	流式细胞术
MFI	mean fluorescent intensity	平均荧光密度
PBS	phosphate buffered saline	磷酸盐缓冲液
TIPE	Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced protein 8	肿瘤坏死因子诱导蛋白 8
TIPE1	TNFAIP8Like1	肿瘤坏死因子诱导蛋白 8 类似蛋白 1
TIPE2	TNFAIP8Like2	肿瘤坏死因子诱导蛋白 8 类似蛋白 2
TIPE3	TNFAIP8Like3	肿瘤坏死因子诱导蛋白 8 类似蛋白 3
PI3K	phosphoinositide 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶
JNK	Jun N-terminal kinase	Jun 氨基末端激酶
ERK	extracellular signal-regulated kinase	细胞外信号调节激酶
TNF	tumor necrosis factor	肿瘤坏死因子
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$	肿瘤坏死因子 $\alpha$
MAPK	mitogen activated protein kinase	丝裂原活化的蛋白激酶
MOMP	mitochondrial outer-membrane permeabilization	线粒体外膜透化
PCNA	proliferating cell nuclear antigen	增殖细胞核抗原
RHO	Rhodamine123	罗丹明 123
PT	permeability transition	线粒体膜通透性转运孔
PIP3	phosphatidylinositol-3-trisphosphate	磷脂酰肌醇-3-三羟甲基氨基甲烷磷酸盐

PI	Promide iodine	碘化丙啶
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
Tris	Trihydroxymethyl aminomethane	三羟甲基氨基甲烷
EDTA	Ethylenediamine tracetic acid	乙二胺四乙酸
Arc	Acrylamide	丙烯酰胺
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺
BSA	Bovine Serum albumin	小牛血清白蛋白
TBS	Tris Buffered Saline	Tris 缓冲液
Caspase-3	Cysteinly aspartate specific protease-3	半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白 酶家族-3
Caspase-8	Cysteinly aspartate specific protease-8	半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白 酶家族-8
FITC	fluorescein isothiocyanate	异硫氰酸荧光素
GFP	green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
DED	Death Effector Domain	死亡效应结构域
NF-κB	nuclear factor- κB	细胞核因子 κB
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction	逆转录多聚酶链反应

## 摘要

肺癌为恶性肿瘤中较为常见的类型之一，而非小细胞肺癌又是肺癌的主要类型，约占肺癌总数 80-85%。Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced protein 8 (TNFAIP8/TIPE) 是 2000 年由 Kumar 等发现的一种和细胞凋亡密切相关的调节蛋白，包含一个死亡效应结构域(DED)，能够抑制 Caspase 介导的细胞凋亡。现有研究提示，TIPE 在人乳腺癌中起到癌基因的作用，同时也有研究揭示 TIPE 与肺癌转移密切关系，但到目前为止，TIPE 在肺癌发生发展中的作用及相关机制并未明晰。本课题首先以免疫组化检测人非小细胞肺癌组织和癌旁 TIPE 表达情况；次以 CCK-8 细胞增殖实验、Annexin V-APC/PI、罗丹明染色流式细胞术检测 TIPE 过表达对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响并以小鼠荷瘤实验观察 TIPE 过表达对肿瘤生长的影响；再以 Western Blot、RT-PCR 检测 TIPE 过表达对细胞相关信号通路及凋亡相关蛋白转录及表达影响，结合信号激酶抑制剂使用，以 CCK-8 细胞增殖实验、Annexin V-APC/PI 流式细胞术探究 TIPE 促增殖、抗凋亡的机制；最后，在肺癌标本上以免疫组化检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达及与 TIPE 在肺癌中表达的关系。

结果显示：首先，肺腺癌组织中 TIPE 表达阳性率高达 100% (50/50)，癌旁组织为弱阳性 (+) 或阴性 (-) 表达，即 TIPE 在肺癌组织中明显高表达；其次，TIPE 过表达明显促进细胞的增殖能力，在 TIPE 过表达的 EL4 和 Raw264.7 细胞中，TIPE 过表达将细胞增殖能力提高两倍以上；小鼠荷瘤实验也发现 TIPE 过表达可使肿瘤的重量增加一倍，体积增加 2 倍以上；再次，TIPE 过表达表现为明显的抗凋亡作用，在紫外线诱导的细胞凋亡实验中，TIPE 过表达可使细胞的凋亡率降低 50% 以上，且此抗凋亡作用表现为抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 表达上调和促凋亡蛋白 Bax、Bad、Bim、Bid、Caspase 等表达及转录水平下降；TIPE 过表达明显激活 MEK、p38、JNK 及 p90rsk 激酶，而 p38 和 JNK 通路抑制剂可逆转顺铂所诱导的细胞凋亡的现象提示，p38 和 JNK 通路在 TIPE 介导的抗凋亡作用中发挥重要作用；有趣的是，当使用 PI3K-AKT 及 MEK 抑制剂后，TIPE 过表达所致的细胞增殖能力增强现象消失；最后，肺腺癌组织免疫组化结果显示，抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达阳性 (+)，癌旁组织表达为阴性 (-)，提示 TIPE

介导的抗凋亡现象可能是通过激活 p38、JNK 通路上调 Bcl-2 而实现的。

综上所述, TIPE 通过激活 PI3K-AKT 促进细胞增殖、激活 p38 和 JNK 等 MAPK 通路介导细胞抗凋亡, 进而在肺癌发生发展中发挥重要作用。

关键词: TNFAIP8 促增殖 抗凋亡 肿瘤细胞 肺癌

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

TIPE was originally identified in human metastatic head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) cell lines. Over-expression of TIPE is associated with enhanced abilities of cell survival, which was mediated by inhibiting of activities of apoptotic enzymes caspase-8 and caspase-3, indicating that TIPE might be act as an oncogene in human cancers. But, until to now, little is known about the role of TIPE in carcinogenesis of lung cancer. In this study, we firstly detected the expression of TIPE and Bcl-2 in lung cancer tissue specimens by immunohistochemical staining; Then, the role of TIPE in cell proliferation and anti-apoptosis effects were explored by CCK-8 cell proliferation assay, Annexin V-APC/PI flow cytometry and nude tumor implantation test respectively by using TIPE over-expression EL4 and /Raw264.7 cell lines; Apoptosis associated protein Mcl-1, Bcl-2, Bcl-XL, Caspase-3, Caspase-8, Bak, Bax, Bad, Bid was detected by Western blot and RT-PCR respective; Using kinases inhibitors, the mechanism of pro-proliferation and anti-apoptosis of TIPE was determined by CCK-8 cell proliferation assay, Annexin V-APC/PI flow cytometry respectively., in EL4 system were determined by RT-PCR.

The results showed that: Firstly, TIPE and Bcl-2 expression were higher in lung adenocarcinoma than adjacent normal of adenocarcinoma did; Secondly, TIPE over-expression could enhance anti-apoptosis effect and cell proliferation abilities in EL4 and Raw264.7 cell. EL4/RAW 264.7-TIPE transfectants were also exhibited enhanced tumor growth in athymic mice; Thirdly, TIPE over-expression could upregulate the expression of Mcl-1, Bcl-2 and down-regulate caspase-8 and caspase-3 in both protein and mRNA levels. Fourthly, TIPE over-expression could activate phosphorylation of MEK, p38, JNK pathway and the enhanced abilities of proliferation and anti-apoptosis were mediated by p38, JNK and PI3K, AKT pathways. All the results presented above indicated that TIPE might be an oncogene in carcinogenesis of lung cancer, which promote cell proliferation by activating p38,



JNK pathway and play anti-apoptosis effect by activating PI3K-AKT pathway.

Key Word: TNFAIP8, proliferation, antiapoptosis, cancer cell, lung cancer

厦门大学博士论文摘要库

# 目 录

缩略语索引 .....	I
摘 要 .....	III
Abstract .....	V
前 言 .....	1
实验材料 .....	3
实验方法 .....	9
实验结果 .....	20
1. TIPE 在非小细胞肺癌中表达 .....	20
2. TIPE 促进肿瘤增殖 .....	22
3. TIPE 可有效拮抗细胞凋亡 .....	26
4. TIPE 在转录翻译水平分别调控凋亡蛋白 .....	27
5. TIPE 通过 MAPK 通路调节细胞凋亡增殖 .....	28
6. TIPE 通过激活 MAPK 通路发挥抗凋亡作用 .....	29
7. TIPE 通过 PI3K-Akt 通路促进细胞增殖 .....	31
8. Bcl-2 在肺腺癌表达与 TIPE 相关 .....	32
讨 论 .....	34
结 论 .....	36
参考文献 .....	38
文献综述 .....	43
攻读学位期间所发表文章 .....	58
致谢 .....	59

## Table of Contents

<b>Abbreviations .....</b>	<b>I</b>
<b>Abstract in Chinese.....</b>	<b>III</b>
<b>Abstract in English .....</b>	<b>V</b>
<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
<b>Materials .....</b>	<b>3</b>
<b>Methods.....</b>	<b>9</b>
<b>Results .....</b>	<b>20</b>
1. TIPE expression in adenocarcinoma tissues.....	20
2. TIPE promote the proliferation of cancer cell.....	22
3. TIPE can enhance the antiapoptosis of cancer cel .....	26
4. TIPE regulate the protein of antiapoptosis.....	27
5. TIPE over-expression activated MAPK.....	28
6. TIPE regulate antiapoptosis by phosphorylation of p38 and JNK .....	29
7. TIPE promoted cell proliferation by phosphorylation of PI3K-AKT .....	31
8. Bcl-2 expression was associated positively with TIPE .....	32
<b>Discussion.....</b>	<b>34</b>
<b>Conclusion .....</b>	<b>36</b>
<b>References .....</b>	<b>38</b>
<b>Article Review .....</b>	<b>43</b>

## 前言

肺癌已经成为恶性肿瘤引起死亡的主要原因, 约占肺癌总数 80-85%。非小细胞型肺癌, 包括鳞癌、腺癌、大细胞癌, 与小细胞癌相比其癌细胞生长分裂较慢, 扩散转移相对较晚<sup>[1-3]</sup>。Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -induced protein 8 (TNFAIP8/TIPE)是 2000 年由 Kumar 等在人的头颈鳞状细胞癌(HNSCC)细胞系上被发现和鉴定的一种和细胞凋亡相关的调节蛋白, 包含死亡效应结构域(DED), 能抑制 Caspase 介导的细胞凋亡<sup>[4-5]</sup>。有文献报道, TNF- $\alpha$  可激活 NF- $\kappa$ B 通路而在各种细胞中诱导 TIPE 表达, TIPE 过表达不仅可增强细胞的存活率, 而且也抑制 Caspase-3 和 Caspase-8 的酶活性<sup>[6-8]</sup>。人乳腺癌细胞系转染 TIPE 后, 细胞增殖和迁移能力显著增强, 肿瘤的生长速度也明显增加<sup>[9]</sup>。在另外一个研究中, TIPE 过表达也显著增强人乳腺癌细胞系 MDA-MB435 的侵袭能力, 并提高了胸腺缺失小鼠肺转移频率<sup>[10]</sup>。在乳腺癌临床标本中, 也发现 TIPE 在肿瘤组织的表达水平远远高于癌旁组织<sup>[9]</sup>, 提示 TIPE 在乳腺癌的发生发展过程中可能起到癌基因的作用。但到目前为止, 尚不明晰 TIPE 在肺癌发生中的作用, 也未对 TIPE 的促肿瘤发生的机制作深入探讨。

癌基因可通过影响肿瘤的增殖、凋亡和成瘤等方面导致肿瘤的发生和发展。细胞凋亡是涉及多基因协同、拮抗、反馈调节等的复杂过程, 这些基因包括 Bcl-2 家族、Caspase 家族等<sup>[11-12]</sup>。细胞凋亡途径可分为三种: 线粒体凋亡途径、内质网信号途径及细胞凋亡的死亡受体途径。当凋亡发生时, 位于线粒体内外膜间的 PT 孔开放引起线粒体跨膜电位改变并激活 Caspase 家族激酶和 Bcl-2 家族蛋白<sup>[13-16]</sup>。Bcl-2 等蛋白可引起线粒体外膜透化(MOMP)过程而促进线粒体膜间隙释放各种促预凋亡因子, 最终导致线粒体凋亡途径的发生<sup>[17]</sup>。根据 Bcl-2 家族蛋白结构中 Bcl-2 同源结构域(BH1-4 domains)的不同, 可分为三个不同的功能组, 即抗凋亡蛋白、促凋亡效应分子及 BH3 结构域蛋白<sup>[18]</sup>。抗凋亡 Bcl-2 家族蛋白可以直接作用和抑制促凋亡 Bcl-2 家族蛋白。而促凋亡 Bcl-2 家族又被分为两类。一类为效应分子(如 Bak, Bax), 它们通过构成蛋白脂针孔引起线粒体外膜透化(MOMP)最终导

致细胞色素 C 的释放<sup>[19-23]</sup>。另一类是只包含有 BH3 同源结构域的 Bcl-2 家族蛋白，它们可以在不同细胞压力作用下直接激活 Bak/Bax 依赖的线粒体外膜透化（如 Bid），或者抑制抗凋亡蛋白作用（如 Bad）<sup>[24-26]</sup>。

本课题首先以免疫组化检测人非小细胞肺癌组织和癌旁 TIPE 表达情况；次以 CCK-8 细胞增殖实验、Annexin V-APC/PI、罗丹明染色流式细胞术检测 TIPE 过表达对肿瘤细胞增殖和凋亡的影响并以小鼠荷瘤实验观察 TIPE 过表达对肿瘤生长的影响；再以 Western Blot、RT-PCR 检测 TIPE 过表达对细胞相关信号通路及凋亡相关蛋白转录及表达影响，结合信号激酶抑制剂使用，以 CCK-8 细胞增殖实验、Annexin V-APC/PI 流式细胞术探究 TIPE 促增殖、抗凋亡的机制；最后，在肺癌标本上以免疫组化检测抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达及与 TIPE 在肺癌中表达的相关性。

结果显示：首先，肺腺癌组织中 TIPE 表达阳性率高达 100%（50/50），癌旁组织为弱阳性（+）或阴性（-）表达，即 TIPE 在肺癌组织中明显高表达；其次，TIPE 过表达明显促进细胞的增殖能力，在 TIPE 过表达的 EL4 和 Raw264.7 细胞中，TIPE 过表达将细胞增殖能力提高两倍以上；小鼠荷瘤实验也发现 TIPE 过表达可使肿瘤的重量增加一倍，体积增加 2 倍以上；再次，TIPE 过表达表现为明显的抗凋亡作用，在紫外线诱导的细胞凋亡实验中，TIPE 过表达可使细胞的凋亡率降低 50%以上，且此抗凋亡作用表达为抗凋亡蛋白 Bcl-2、Mcl-1 表达上调和促凋亡蛋白 Bax、Bad、Bim、Bid、Caspase 等表达及转录水平下降；TIPE 过表达明显激活 MEK、p38、JNK 及 p90rsk 激酶，而 p38 和 JNK 通路抑制剂可逆转顺铂所诱导的细胞凋亡的现象提示，p38 和 JNK 通路在 TIPE 介导的抗凋亡作用中发挥重要作用；有趣的是，当使用 PI3K-AKT 抑制剂后，TIPE 过表达所致的细胞增殖能力增强现象消失；最后，肺腺癌组织免疫组化结果显示，抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达阳性（+），癌旁组织表达为阴性（-），提示 TIPE 介导的抗凋亡现象可能是通过激活 p38、JNK 通路上调 Bcl-2 而实现的。

综上所述，TIPE 在肺腺癌中高表达，同时在细胞水平及动物实验均证明 TIPE 过表达可促进细胞增殖且拮抗凋亡，进一步研究显示 TIPE 此种作用通过激活 MAPK 及 PI3K-AKT 实现，最后临床样本显示 Bcl-2 在肺腺癌的表达极可能与 TIPE 有关。

## 实验材料

### 1 实验动物

裸鼠，4-6 周左右，雌性。购自中国科学院上海实验动物中心，饲养于厦门大学实验动物中心 SPF 级的动物房中。

### 2 主要试剂

#### 2.1 细胞培养相关试剂

- (1) RPMI 1640 培养液 (RPMI Medium 1640) (美国 Gibco)
- (2) DMEM 培养液 (美国 Thermo)
- (3) 胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) (美国 Gibco)
- (4) HEPES (美国 Sanland Chemical)
- (5)  $\beta$ -巯基乙醇 (鹭隆生物)
- (6) 胰酶 (Trypsin) (鹭隆生物)
- (7) 生理盐水: NaCl 9 g 溶于 900 ml 双蒸水中, 最后用双蒸水定容至 1 L。
- (8) p38 MAPK 抑制剂 SB203580 (美国 Cayman Chemical)
- (9) PI3K 抑制剂 LY294002 (美国 Cayman Chemical)
- (10) MEK1/2 抑制剂 PD98059 (美国 CST)
- (11) JNK 抑制剂 SP600125 (美国 Alexis)
- (12) p-ERK 抑制剂 U0126 美国 CST)
- (13) Cell Counting Kit-8 (CCK-8 试剂盒) (日本同仁化学研究所)
- (14) 磷酸盐缓冲液 (PBS):
- (15) NaCl 8 g, KCl 0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.44 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.24 g, 溶于 800 ml 双蒸水中, 用 HCl 调节溶液的 pH 值至 7.4, 双蒸水定容至 1 L。

#### 2.2 免疫组化相关试剂

- (1) 硅化粘附玻片 (福州迈新)
- (2) 浓缩柠檬酸型抗原修复液 (福州迈新)

- (3) UltraSensitive™ S-P (Mouse/Rabbit) 超敏 SP 试剂盒 (福州迈新)
- (4) UltraSensitive™ S-P (Goat) 超敏 SP 试剂盒 (福州迈新)
- (5) 酶底物显色剂 DAB (福州迈新)
- (6) 中性树胶 (水剂) (福州迈新)

## 2.3 Western Blot 相关试剂

- (1) RIPA 裂解液 (强) (碧云天)
- (2) 蛋白磷酸酶抑制剂 (北京普利来)
- (3) 磷酸酶抑制剂 (瑞士 Roche)
- (4) 兔抗 GAPDH 一抗 (北京康为世纪生物科技有限公司)
- (5) 羊抗 CD137L 一抗 (美国 Santa Cruz)
- (6) 鼠抗  $\beta$ -actin 一抗 (美国 Santa Cruz)
- (7) 兔抗磷酸化 p44/42 MAPK 一抗 (美国 CST)
- (8) 兔抗磷酸化 p38 MAPK 一抗 (美国 CST)
- (9) 兔抗磷酸化 JNK 一抗 (美国 CST)
- (10) 兔抗 Bcl-2 一抗 (美国 CST)
- (11) 兔抗 Mcl-1 一抗 (美国 CST)
- (12) 兔抗磷酸化 p90rsk 一抗 (美国 CST)
- (13) HRP-羊抗兔二抗 (鹭隆生物)
- (14) HRP-驴抗鼠二抗 (美国 CST)
- (15) HRP-驴抗羊二抗 (美国 Santa Cruz)
- (16) 化学发光底物试剂盒 (美国 Millipore)
- (17) 预染蛋白 Marker (美国 Fermentas)
- (18) Loading Buffer (5 $\times$ ) :
- (19) 溴酚蓝 25 mg, SDS 0.5 g, 甘油 2.5 ml ;
- (20) 用 2.5 ml 0.5 M Tris (pH 6.8) 溶液溶解后再加 2.5 ml 甘油混匀, 500  $\mu$ l/份分装, 每份使用前加 25  $\mu$ l  $\beta$ -巯基乙醇。
- (21) 电泳缓冲液 (1 $\times$ ) :  
Tris 碱 3.03 g, 甘氨酸 18.8 g, SDS 1 g;  
溶于 800 ml 双蒸水中, 用少量浓 HCl 调酸碱度为 pH 8.3, 双蒸水定容

至 1 L。

(22) 半干转液 (1×) :

Tris 碱 2.9 g, 甘氨酸 14.4 g, 甲醇 200 ml;

加双蒸水溶解并定容至 1 L。

(23) TBST 缓冲液 (1×) :

Tris 碱 2.42 g, NaCl 8.8 g, Tween-20 500  $\mu$ l;

溶于 800 ml 双蒸水中, 调酸碱度为 pH7.5, 双蒸水定容至 1 L。

(24) 封闭液: 5 g 脱脂奶粉溶于 100 ml TBST 中溶解混匀。

(25) 丽春红染色液:

丽春红 S 0.2 g, 三氯乙酸 3 g, 5-磺基水杨酸 3 g;

加双蒸水溶解并定容至 100 ml。

## 2.4 流式细胞术检测相关试剂

(1) Annexin V-APC/7-AAD 双染细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物)

(2) 凯基细胞周期检测试剂盒 (凯基生物)

(3) Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒 (凯基生物)

(4) 罗丹明

## 2.5 RAW264.7-TIPE -PCR 相关试剂

(1). TRIzol (中国大连 Tarkara)

(2). PrimeScript Reverse Transcriptase (中国大连 Tarkara)

(3). SYBR® Premix Ex Taq™ (中国大连 Tarkara)

(4). 引物: 本课题所用 RT-PCR 引物见下表



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库